

Aus dem Institut für Humangenetik
und Anthropologie der Universität
Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.G.RÖHRBORN)

Die mutagene Wirkung von Methyl -
methan - sulfonat (MMS) auf das
Knochenmark adulter NMRI Mäuse und
embryonale Leber.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Amir Hossein Simaifar

1979

Aus dem Institut für Humangenetik
und Anthropologie der Universität
Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.G.RÖHRBORN)

Die mutagene Wirkung von Methyl -
methan - sulfonat (MMS) auf das
Knochenmark adulter NMRI Mäuse und
embryonale Leber.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Amir Hossein Simaifar

1979



Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.H.Reinauer

Referent

gez.: Prof.Dr.G.Röhrborn

Korreferent

gez.: Prof.Dr.F.K.Ohnesorge

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf.

Ich erkläre an Eides statt,
daß ich die vorliegende Arbeit
ohne unerlaubte Hilfe angefer-
tigt und das von mir benutzte
Schrifttum vollständig ange-
geben habe.

Düsseldorf, 1979

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Die chemischen, mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften von MMS	11
3. Material und Methoden	16
3.1. Versuchstiere	16
3.2. Testsubstanz	16
3.3. Knochenmarkanalyse	17
3.3.1. Versuchsaufbau	17
3.3.2. Knochenmarkpräparation	18
3.3.3. Kriterien der Auswertung	20
3.4. Dominant-Letal-Test	22
3.5. Chromosomenanalyse der im DL-Test überlebenden Embryonen	25
3.5.1. Chromosomenpräparation	25
3.5.2. Kriterien der Auswertung	29
3.6. Diaplazentare Mutagenese	30
3.7. Statistik	31
4. Ergebnisse	33
4.1. Toxizität	33
4.2. Chromosomenanalyse des Knochenmarks	35

	Seite
4.3. Dominant-Letal-Test	40
4.4. Chromosomenanalyse der im DL-Test überlebenden Embryonen	41
4.5. Diaplazentare Mutagenese	44
5. Diskussion	48
6. Zusammenfassung	57
7. Literaturverzeichnis	59

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der heutige Mensch ist einer Fülle von chemischen Verbindungen aller Art exponiert. Einen großen Teil dieser Verbindungen nimmt er unfreiwillig, ja unbewußt auf. Bereits 1946 - die Arbeit wurde wegen der Geheimhaltungsvorschrift im Krieg verspätet publiziert - erkannten AUERBACH und ROBSON sowie 1943 OEHLKERS und 1946 RAPOPORT, daß chemische Verbindungen das genetische Material in schädlicher Weise beeinflussen können. Seit dieser Zeit wurde eine große Anzahl von Verbindungen auf ihre genetische Aktivität hin untersucht (Zusammenstellung bei BARTHELMESS 1956 und 1970 sowie bei RÖHRBORN 1960 und 1965 a). Die Mehrzahl dieser Verbindungen wurde jedoch entsprechend dem Entwicklungsstand der chemischen Mutagenese an niederen Organismen untersucht.

Seit einigen Jahren ist man sich darüber im klaren, daß eine für den Menschen relevante Aussage nur nach Mutagenitätsbefunden am Säuger in vivo gezogen werden kann. Eine größere

Anzahl von Untersuchungsmethoden am Säuger ist heute ausgereift. So kennt man Methoden zum zytologischen Nachweis von Chromosomenaberrationen sowohl in Soma- als auch in Keimzellen. Auch ist eine Anzahl von Testmethoden bekannt, die den Nachweis von Mutationen im submikroskopischen Bereich erlauben.

Seit der Entdeckung der Mutagenese wurden verschiedene Testsysteme entwickelt, die es erlauben, die mutagenen Wirkungen der physikalischen und chemischen Umwelteinflüsse nachzuweisen. Selbstverständlich ist es nicht gerechtfertigt, nur zum Zwecke der Mutagenitätsprüfung Menschen zu behandeln. Befindet sich jedoch eine Substanz im Verträglichkeitstest am Menschen oder in der frühen klinischen Erprobung, so sollten diese Tests unter Chromosomenkontrolle durchgeführt werden, da möglicherweise einige Substanzen nur im Menschen, nicht aber im Tier mutagen wirken können.

Um Mutagenitätsuntersuchungen die erforderlich hohe Relevanz für den Menschen zu verleihen

hen, werden die Tests an Spezies durchgeführt, die dem Menschen nahe verwandt sind. Dies besonders deshalb, weil der Stoffwechsel von Säugern für solche Untersuchungen von ausschlaggebender Bedeutung ist und viele Stoffe bei den Säugern eine mutationsauslösende Wirkung besitzen. Sowohl aus diesen wie auch aus finanziellen und räumlichen Gründen bieten sich vor allem Kleinsäuger, wie z.B. Maus, Ratte oder Hamster an.

Im folgenden sei kurz auf einige der heute im Routinetest eingesetzten Methoden eingegangen.

a) Chromosomenanalyse aus dem Knochenmark.

Die postfetale Blutbildung erfolgt beim Menschen und Säugetier im Knochenmark. Während sich vor Abschluß des Längenwachstums auch das Mark der Röhrenknochen an der Hämatopoese beteiligt, sind es beim Erwachsenen nur noch die kurzen Plattenknochen, wie z.B. Scapula, Sternum, Wirbelkörper und Beckenknochen, die blutbildendes rotes Mark enthalten. Im Markkanal der Röhren-

knochen findet sich dann gelbes Fettmark, das durch Fettspeicherung der retikulären Bindegewebszellen entsteht.

Die Hämatopoese ist grundsätzlich in 3 verschiedene Reifungsprozesse zu unterteilen:

1. Erythropoese
2. Granulopoese
3. Thromopoese

In jeder dieser Entwicklungsreihen lassen sich verschiedene Zelltypen sowohl nach morphologischen als auch nach funktionellen Gesichtspunkten unterscheiden. Als Endprodukte der Hämatopoese finden sich Erythrozyten, die verschiedene Formen von Granulozyten und Thrombozyten im peripheren Blut bilden. Wegen der relativ kurzen Lebensdauer der Blutkörperchen, bei menschlichen Erythrozyten beträgt sie ca. 4 Monate, während Granulozyten schon nach etwa 10 Tagen wieder abgebaut werden, besteht ein immenser Bedarf an Neubildung. Ausdruck dessen ist die, verglichen mit anderen Geweben, sehr

hohe Proliferationsrate des Knochenmarkparenchym. Aufgrund dieser Eigenschaft ist das Knochenmark für eine Chromosomenanalyse besonders geeignet: Es herrscht kein Mangel an sich gerade in Teilung befindlichen Zellen, was die Untersuchung einer genügend großen Zahl von Metaphasenplatten ermöglicht.

Als Versuchstiere werden Säuger (Hamster oder Mäuse) bevorzugt verwendet. Zwei Stunden vor Präparationsbeginn wird Colcimid zur Anreicherung der Metaphasen im Knochenmark appliziert. Nach Tötung der Tiere wird das Knochenmark aus den Oberschenkelknochen herauspräpariert. Die Zellen erfahren eine hypotone Behandlung, sie werden fixiert, auf einen Objektträger aufgetragen und schließlich gefärbt.

b) Dominant-Letal-Test.

Der Dominant-Letal-Test ist eine der bekanntesten Methoden zum Nachweis chemisch induzierter Mutationen. Gleichzeitig gilt ein positiver Nachweis in diesem System mit als härtester Indikator für eine Mutagenität auch beim Men-

schen. Die grundsätzlichen Züge und die Praktik dieser Methode beschrieben BATEMANN (1958, 1960), RUSSEL et al. (1954), GRÜNEBERG (1965), RÖHRBORN (1965 a und b), SHERIDAN (1965). Die Autoren konnten mit Hilfe dieses Tests die mutagene Wirkung von Röntgenstrahlen als auch eine Anzahl chemischer Verbindungen nachweisen.

Bei diesem Test werden weibliche oder männliche Versuchstiere behandelt und anschließend verpaart. An trächtigen weiblichen Tieren wird zwischen dem 13. und 16. Tag p.c. geprüft, ob dominante Letalmutationen induziert wurden.

Der Nachweis einer Mutagenität erfolgt bei diesem Test nach Behandlung der Parentalgeneration in der ersten Filialgeneration. Dieses hat den Vorteil, daß parallel zu dem mutagenen Effekt bewiesen wird, daß eine Substanz die Keimzellen erreichen kann und in diese zur Auslösung eines mutagenen Schadens auch eindringt.

c) Diaplazentare Mutagenese.

Bei diesem Test wird geprüft, ob chemische Substanzen die Plazentaschranke überwinden und Chromosomenschäden in Embryonen induzieren. Hierzu wird, wie in Untersuchungen von BASLER et al. (1977), RÖHRBORN und BERRANG, H. (1966), INUI et al. (1978) vorgenommen, trächtigen Säugern (Maus, Chin. Hamster, Goldhamster) die zu testende Substanz appliziert. Nach gewisser Einwirkungszeit werden Chromosomen der diaplazentar behandelten Embryonen zytologisch analysiert.

Mit Hilfe dieser Testsysteme sollte der als mutagen bekannte Stoff MMS unter Berücksichtigung folgender Fragestellung an weiblichen NRMI-Mäusen untersucht werden:

1. Es ist bekannt, daß MMS Mutationen in Mikroorganismen zu induzieren vermag (PROPPING, P. et al. 1973). In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, ob beim Säuger in vivo strukturelle Chromosomenaberrationen in den Somazellen induziert werden. Diese Unter-

suchungen sollten am Knochenmark von Mäusen des NRMI-Stammes durchgeführt werden.

2. Desweiteren soll untersucht werden, ob Mutationen in den Keimzellen des Säugers induziert wurden. Untersuchungen hierzu liegen bereits von EHLING (1977) vor. In den von ihm durchgeführten Experimenten wurden männliche Mäuse mit MMS behandelt, für 1-4 Tage mit weiblichen unbehandelten Mäusen verpaart und am 16. Tag nach der Konzeption wurde der Uterusinhalt seziiert und auf induzierte dominante Letalmutationen hin untersucht. Dabei zeigte sich, daß 10 mg MMS/kg die Rate an Letalmutationen gegenüber der Kontrolle nicht erhöhte.

Um zu untersuchen, ob Oocyten in der präovulatorischen Phase sensibler auf chemische Mutagene, in diesem Fall MMS, reagieren, sollen in den hier vorgelegten Versuchen weibliche Mäuse mit der Testsubstanz behandelt werden. Anschließend werden sie mit unbehandelten männlichen Mäusen verpaart und der Uterusinhalt am 16. Tag auf induzierte Muta-

tionen hin untersucht.

3. BASLER et al. (1976 b) zeigten, daß nicht alle induzierten strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen während der frühen Embryogenese eliminiert werden oder zu dominanten Letalmutationen führen. So fanden sie am 17. Tag der Trächtigkeit noch lebende Embryonen mit vererbten Aneuploiden und strukturellen Chromosomenaberrationen.

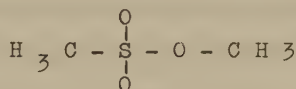
In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, ob MMS zu dominanten Letalmutationen führt oder unter den lebenden Embryonen noch eine erhöhte Rate an Chromosomenaberrationen zu finden ist, wie in dem von BASLER et al. (1976 b) mit Trenimon durchgeführten Versuch.

4. Die Untersuchung von BASLER et al. (1977) zeigte ~~desweiteren~~, daß induzierte Chromosomenaberrationen während der Embryogenese zum überwiegenden Teil eliminiert werden. Daher können Untersuchungen an 16 1/2 Tage

alten lebenden Embryonen nur bedingt aussagen, ob Embryonen durch eine Testsubstanz geschädigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb trächtige Mäuse mit der Testsubstanz behandelt werden und die diaplazentar behandelten Embryonen auf induzierte Chromosomenaberrationen hin untersucht werden.

2. DIE CHEMISCHEN, MUTAGENEN UND KANZEROGENEN
EIGENSCHAFTEN VON MMS.

Methyl-Methansulfonat ist eine farblose Flüssigkeit mit einem Molekulargewicht von 110,13; der Siedepunkt liegt bei 202 - 203⁰ C. Die Strukturformel lautet:



MMS ist spektroskopisch bestimmbar. MMS ist in nicht polarem Lösungsmittel schwach lösbar und im Wasser lösbar (1 : 5). Methyl-Methansulfonat findet Anwendung als Katalisator bei der Polymerisation und desweiteren als Insektizid. Methylierung von MMS findet in der Leber statt und zwar im Zeitraum von 15 Minuten (50 %) bis max. 2-4 Stunden.

Diese Substanz wurde bereits in mehreren Untersuchungen auf eine mutagene Wirkung hin untersucht. So behandelte EHLING (1977) im Dominant-Letal-Test weibliche Mäuse mit 10, 20 oder 150 mg MMS/kg.

Dominante Letalmutationen wurden nachgewiesen und zwar dosisabhängig.

Untersuchungen von ARNOLD (1975) an weiblichen Mäusen zeigen eine deutliche Mutagenität nach Injektion von 100 mg MMS/kg an.

MACHEMER (1976) injizierte weiblichen Mäusen 20, 40 oder 80 mg MMS/kg. Induzierte dominante Letalmutationen konnten nachgewiesen werden.

VOLLMAR und STUCKY (1975) führten eine Untersuchung an männlichen Mäusen nach Applikation von 5 - 20 mg MMS/kg durch. Die behandelten männlichen Mäuse wurden mit unbehandelten weiblichen Mäusen verpaart. Die Grenze der Feststellbarkeit einer dominanten Letalmutation lag in dem Versuch bei einer Dosis von 10 mg MMS/kg.

In den von KRATOCHVIL und BREWEN (1975) durchgeführten Versuchen an weiblichen Mäusen mit 20 - 40 mg MMS/kg zeigte sich ein leichter Anstieg von dominanten Letalmutationen.

In der ersten und zweiten Woche nach der Injektion von 50 mg MMS/kg erzielte PARKIN (1973) bei 38,4 % der Mäuse dominante Letalmutationen.

DEAN, JOHNSTONE (1977) applizierten männlichen Mäusen i.p. eine Injektion von 20, 40 oder 80 mg MMS/kg und verpaarten sie mit weiblichen Mäusen. Es zeigte sich eine Reduktion der fetalen Implantate.

PAYNE (1977) injizierte weiblichen Mäusen i.v. 50 und 100 mg MMS/kg und verpaarte sie anschließend mit unbehandelten Männchen. Es wurden weniger Chromosomenaberrationstypen festgestellt als bei der Behandlung von post-meiotischen männlichen Zellkernen.

PERSTON et al. (1976) applizierten i.p. jungen männlichen Mäusen 25 - 100 mg MMS/kg. Die behandelten männlichen Tiere werden mit weiblichen Mäusen, die mit Hormonen vorbehandelt wurden, verpaart. Die Rate an induzierten Chromosomenaberrationen korrelierte mit Befunden des Dominant-Letal-Tests bei der gleichen MMS-Dosis und dem gleichen Zeitintervall.

ADLER (1977) injiziert i.p. männlichen Mäusen 40 mg MMS/kg und verpaart sie mit unbehandelten weiblichen Mäusen. Unter 250 männlichen F_1 Mäusen gab es 14 sterile und 14 partiell sterile männliche F_1 Mäuse (11,2 %). Alle partiell ste-

rilen und sterilen Männchen zeigen sich zytologisch als Träger von Translokationen. Eine bedeutende Zunahme der herbeigeführten erblichen Translokation konnte bei der MMS Behandlung im postmeiotischen Zellkernstadium der männlichen Mäuse gezeigt werden. Ein Karzinogenitätstest wurde von CLAPP (1968) durchgeführt. Er gab Mäusen im Alter von 11 Wochen täglich 20 mg/100 ml MMS in das Trinkwasser. Bei den überlebenden Tieren wurde primär Pulmonal Adenom, Thymus Lymphoma und andere Tumoren wie predominant reticulum Zellsarkome beobachtet. FREI und VENITS (1975) injizierten männlichen Mäusen 120 mg MMS/kg i.p. Diese applizierte Dosis führte zu einer hohen Rate an Thymus Lymphomata.

DRUCKREY (1971) applizierte weiblichen Ratten 10, 20, 40 oder 68 mg MMS/kg. Es wurden bei 6 der Neugeborenen maligne Tumoren auf dem Nervensystem beobachtet (2 Hirntumore, 6 Tumore auf dem peripheren Nervensystem). Weiterhin beobachtete man Hammandrüsenkarzinom und Nephroblastom bei Ratten, die mit 40 mg MMS/kg behandelt worden waren.

KLEIHUES (1969) und STAVROU (1971) beobachteten

ebenfalls bei Mäusen Hirntumoren nach MMS-Applikation.

DRUCKREY et al. (1970) stellten bei Ratten, denen bei wöchentlicher i.v. Injektion 4 oder 8 mg MMS/kg (Gesamtdosis 184-386 mg/kg) injiziert wurde, Hauttumoren fest.

SWANN und MAGEE (1969) applizierten 72 - 120 mg MMS/kg i.p. bei Ratten. Sie beobachteten Hirntumore, Meningiome und periphere Nervensystemtumore.

IVANKOVIC (1970) beobachtete bei Ratten nach Injektion von 125 mg MMS/kg Sarkome.

3. MATERIAL UND METHODEN.

3.1. Versuchstiere

Weibliche NRMI Mäuse im Alter von 10 - 12 Wochen wurden für experimentelle Untersuchungen aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Düsseldorf verwendet. Das Gewicht der Tiere lag vor der Behandlung zwischen 28-30 g. Die Behandlung der Tiere erstreckte sich auf verschiedene Gruppen. Allen untersuchten Mäusen wurde die gewählte mutagene Substanz (MMS) intra-peritoneal injiziert.

3.2. Testsubstanz

Methyl-Methansulfonat (MMS) wurde als reine Substanz von der Firma Merk (Deutschland) bezogen. Für unsere experimentelle Arbeit wurde die Testsubstanz in physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Die pro Tier applizierte Lösung betrug 0,5 ml. Die Applikation erfolgte intraperitoneal.

3.3. Knochenmarkanalyse

3.3.1. Versuchsaufbau

Im Versuch wurden insgesamt 40 Tiere mit Methyl-Methansulfonat (MMS) behandelt. Den weiblichen Mäusen wurde 10, 20, 40 oder 80 mg MMS/kg intraperitoneal injiziert. Die Tiere werden 24 Stunden nach Applikation von MMS getötet und das Knochenmark aufgearbeitet. Bei der Verabreichung von 80 mg/kg führte MMS in allen Fällen schon vor Ablauf des geplanten Zeitraumes zum exitus letalis (30-150 Minuten nach Injektion).

Die Injektion von 10, 20 und 40 mg/kg führte zu keinem Absterben der Tiere. Aufgrund dieses Resultates wurden für den Versuch folgende 3 Dosierungen gewählt:

- a) 10 mg MMS / kg
- b) 20 mg MMS / kg
- c) 40 mg MMS / kg

Insgesamt wurden 30 Versuchstiere und 10 unbehandelte Kontrolltiere untersucht.

3.3.2. Knochenmarkpräparation

Die Chromosomenpräparation erfolgte nach der von SCHMID (1971) entwickelten und von MILTENBURGER (pers. Mitteilung) wie folgt modifizierten Methode:

- a) Intraperitoneale Injektion von MMS.
- b) 22 Stunden nach der MMS Applikation wird 10 mg Colchicin (Serva) pro kg Körpergewicht i.p. injiziert.
- c) 24 Stunden nach der MMS Injektion werden die Tiere durch Genickbruch getötet.
- d) Die beiden Oberschenkelknochen (Femora) werden sauber herauspräpariert.
- e) Distale und proximale Femorepiphysen werden abgeschnitten und der Knochenmarkkanal eröffnet.
- f) Das Knochenmark beider Femora wird mit 2 ml 30 - 37° C warmer physiologischer Hanks'-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gespült.
- g) Das ausgespülte Material wird gut aufpettiert und anschließend bis 1500 rpm 5 Minuten zentrifugiert.

- h) Der Überstand wird verworfen und das Sediment wird mit ca. 4 ml einer 1 %-igen Natrium-Citratlösung in 30° C₂ vorgewärmten Wasserbad hypoton behandelt.
- i) Nach 20 minütiger hypotoner Behandlung wird die Suspension 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment gut aufgeklopft.
- j) Zur Fixierung werden 4 ml eines frisch zubereiteten Essigsäure-Äthanol-Gemisches (Mischungsverhältnis 1:2,5) dem Sediment unter ständigem Aufklopfen zugesetzt, gut aufpipettiert und dann für 30 Minuten im Kühlschrank stehengelassen.
- k) Das Zentrifugieren wird wiederholt (1500 rpm für 5 Minuten).
- l) Der Überstand wird verworfen und das Sediment in frisch zubereitetem Essigsäure-Äthanol-Gemisch fixiert und über Nacht im Kühlschrank stehengelassen.
- m) Aufbringen des Materials auf Objektträger:
Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 1500 rpm wird der Überstand verworfen. Dem Sediment wird tropfenweise 0,5 ml frisches Fixativ (Essigsäure-Äthanol-Gemisch 1:2,5) zugesetzt,

bis eine milchige Suspension entsteht.

Diese Suspension wird auf eisgekühlte, mit aqua dest. benetzte Objektträger aufgetropft, die dann über dem Bunsenbrenner abgeflammt werden.

- n) Die luftgetrockneten Präparate werden 10 Minuten in 10 ml Giemsa und 190 ml gepuffertem (PH 7,0) aqua dest. gefärbt und anschließend zweimal gespült in aqua dest.
- o) Nach einer Lufttrocknung der Präparate werden die Objektträger mit Eukitt eingedeckt.

3.3.3. Kriterien der Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung. Von jedem Tier wurden 100 Metaphasen auf strukturelle Aberrationen hin untersucht. Polyploide und aneuploide Metaphasen wurden nicht gewertet. Die Untersuchung erstreckte sich somit auf folgende Aberrationstypen:

1. Chromatidengap G'

Isochromatidengap G''

Def.: Färberische Lücke in einer bzw. in beiden Chromatiden.

2. Chromatidenbruch B'

Chromosomenbruch B''

Def.: Unterbrechung der Kontinuität der Chromatiden- bzw. Chromosomenstruktur mit achsengerechter oder achsenverschobener Dislokation des Bruchstückes.

3. Chromatidendeletion D'

Chromosomendeletion D''

Def.: Interkalärer oder terminaler Substanzverlust auf Chromatiden- bzw. Chromosomenebene.

4. Chromatidenfragment F'

Chromosomenfragment F''

Def.: Azentrisches Chromatiden- bzw. Chromosomensegment.

5. Exchange

Def.: Vereinigung von Bruchenden zweier oder mehrerer Chromatidbrüche innerhalb eines Chromosoms (Intrachange) oder in mehreren Chromosomen (Interchange).

6. Multiple Aberrationen

Def.: Es sind mehr als 5 Aberrationen pro Zelle vorhanden.

3.4. Dominant-Letal-Test

Die weiblichen Tiere werden mit pregnant mare's serum (PMS) vorbehandelt, um die Ovulation zu stimulieren. PMS (Hersteller Schering AG., Deutschland) wird aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnen und hat die Wirkung, die der des follikelstimulierenden Hormons (FSH) des Hypophysenvorderlappens entspricht. Beim weiblichen Tier bewirkt es die Bildung der Follikel im Eierstock und ist an der Auslösung der Brunst beteiligt.

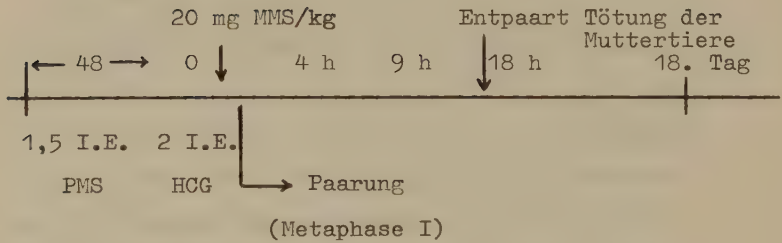
Den Tieren wurden 2 internationale Einheiten PMS verabreicht. 48 Stunden danach bekamen dann die Tiere 1,5 j.u. HCG, d.h. Human Chorion Gonadotropin. HCG (Hersteller Organon, Deutschland) wird aus dem Harn schwangerer Frauen gewonnen. Es stimmt in seiner Wirkung mit ICSH (LH), d.h. zwischenzellenstimulierendes Hormon, überein. Bei einem bestimmten Verhältnis von ICSH und FSH tritt die Ovulation und die Ausbildung des

Corpus Luteum ein. Kurz nach Verabreichung von HCG wurden die Tiere mit Methyl-Methansulfonat (MMS) behandelt, und zwar mit einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht. Eine Stunde nach der Gabe von MMS wurden die weiblichen Mäuse (NRMI) mit unbehandelten männlichen Mäusen (NRMI) 1:3 gepaart. Am darauffolgenden Morgen wurden die Weibchen auf positiven Vaginalpfropf hin geprüft.

Der Vaginalpfropf bildet sich aus einem Sekret akzessorischer Drüsen des Männchens und verschließt die Vagina des Weibchens vom Cervixkanal bis zur Vulva über einen Zeitraum von mehreren Stunden. 18 Tage nach der Konzeption werden die Weibchen getötet und sezziert, die Zahl der lebenden und toten Embryonen wird bestimmt. Ist die Zahl der toten Implantate im Versuch gegenüber den Werten der mitlaufenden Kontrolle erhöht, so ist dies ein sicheres Kriterium für die Indikation dominanter Letalmutationen.

In diesem Versuch wurde mit 12 trächtigen Tieren gearbeitet. Die Muttertiere wurden am 18. Tag durch Genickbruch getötet. Die Auswertung im DL-Test beschränkte sich auf die Zählung lebender

und toter Implantate pro Weibchen. Die Corpora Lutea wurde nicht registriert.



Schema des angesetzten Tierversuches.

3.5. Chromosomenanalyse der im DL-Test überlebenden Embryonen.

3.5.1. Chromosomenpräparation

Nach Auswertung des DL-Testes wurden die Lebern lebender Embryonen dieses Versuchsansatzes wie folgt zytologisch aufgearbeitet (DATTA et al. (1970), modifiziert von BASLER (pers.Mitteilung)):

- a) Zur Präparation von Metaphasenplatten werden am 18. bis 19. Tag nach der Konzeption trächtige Mäuse durch Genickbruch getötet und die überlebenden Embryonen freipräpariert. Die embryonalen Lebern werden so schnell wie möglich entnommen und in vorgewärmte Blockschälchen (37°) übertragen.
- b) 1 ml 37° C warmes minimal essentielles Medium (Tabelle 1, Seite 28) wird zugegeben und die Lebern werden zerkleinert durch Schneiden in 3 - 4 Stücke und anschließendes mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle in eine Spritze.
- c) Die Suspension wird in ein Zentrifugenröhrchen übertragen, das 4 ml 37° C warmes MEM

enthält. Colchicin-Stammlösung (0,33 mg auf 10 ml H_2O) wird zur Zellsuspension zugegeben.

- d) Die Suspension wird für 1 1/2 bis 2 Stunden bei 37° C im Wasserbad inkubiert und danach 5 Minuten zentrifugiert bei 1500 rpm. Der Überstand wird verworfen. Das Sediment wird aufgeschüttelt.
- e) Die hypotone Behandlung erfolgt für 20 Minuten bei 30° C im Wasserbad mit 4 ml einer 1 %-igen Natriumcitratlösung. Danach erfolgt erneutes zentrifugieren (5 Minuten bei 1500 rpm).
- f) Der Überstand wird wiederum bis auf wenige Tropfen abpipettiert, dann erfolgt die Fixierung der Zellen mit Essigsäure-Äthanol-Gemisch (1:2,5). Die Fixierung muß langsam und tropfenweise erfolgen, damit das Zellmaterial nicht verklumpt. Die Suspension wird für 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt.

- g) Nach 30 Minuten wird die Zentrifugation und die Fixierung wiederholt. Anschließend wird die Zellsuspension auf kalte, naße Objektträger aufgetropft, verblasen und kurz durch die Flamme gezogen.

- h) Die luftgetrockneten Präparate färbt man mit Giemsa (10 ml Giemsa + 190 ml gepuffertes H_2O , PH 7). Die Färbedauer beträgt 10 Minuten. Anschließend erfolgt eine Differenzierung in aqua dest.

- i) Nach Lufttrocknung der Präparate werden die Objektträger mit Eukitt eingedeckt.

(Tabelle 1): Minimal essentielles Medium mg/Liter

L-Arginin HCl	126,4
L-Cystin Na ₂	28,42
L-Glutamin	292,3
L-Histidin HCl H ₂ O	41,90
L-Isoleucin	52,50
L-Leucin	52,50
L-Lysin HCl	73,06
L-Methionin	14,90
L-Phenylalanin	33,02
L-Threonin	47,64
L-Tryptophan	10,20
L-Tyrosin	36,22
L-Valin	46,90
D-Ca Pantothenat	1,00
Cholinchlorid	1,00
i-Inosit -	2,00
Nicotinamid	1,00
Pyridoxal HCl	1,00
Riboflavin	0,10
Thiamin HCl	1,00

3.5.2. Kriterien der Auswertung.

Die Auswertung wurde folgendermaßen durchgeführt: Je Embryo wurden 50 Metaphasen mikroskopisch ausgewertet.

Für die Analyse von jeweils 50 Zellen pro Embryo bestehen folgende Gründe:

Erstens sollte eine in der Oocyte gesetzte Chromosomenaberration in den Zellen des Embryos auffindbar sein, da diese über die Zygote eingebracht wurde und daher in der Körperzelle identisch vorliegen muß.

Zweitens ist dennoch eine Analyse nicht nur einer Platte pro Embryo sinnvoll, weil über die Oocyte in die Zygote eine erhöhte Chance zur Chromosomenbrüchigkeit induziert werden könnte.

Die Tatsache, daß es auch beim Menschen Erbkrankheiten gibt, bestätigt die Untersuchung somatischer Zellen, bei denen man eine erhöhte Neigung zu Chromosomenbrüchigkeit fand. Erwähnt sei hier die Fanconi-Anämie und das Bloom's Syndrom.

Es ist zu bemerken, daß natürlich die Analyse von mehreren Zellen pro Embryo eine viel sichere Aussage liefert. Findet man z.B. eine Hyperploidie oder eine Hypoploidie in nur einer von mehreren untersuchten Zellen, so kann es sich hierbei um einen artifiziellen Befund handeln, da zufällig ein Chromosom bei der Präparation "weggeschwommen" sein kann, oder ein solches zufällig von einer anderen Metaphase stammen könnte. Findet man jedoch in allen 50 Metaphasen eine Hyper- oder Hypoploidie oder eine strukturelle Aberration, so kann dies als sicherer Effekt einer Substanzwirkung angesehen werden.

3.6. Diaplazentare Mutagenese.

Weibliche NRMI Mäuse wurden im Verhältnis 1:3 mit unbehandelten männlichen Mäusen verpaart. Ovulation und Verpaarung finden in der Regel nachts statt. Am Morgen nach der Verpaarung wird durch Sondieren der Vagina das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes geprüft. Dieser Tag zählt als erster Tag der Tragzeit, die 20 - 21

Tage dauert. Am 17. Tag wurde den Tieren 20 oder 40 mg MMS/kg und bei den Kontrolltieren NaCl-Lösung intraperitoneal appliziert. Am 18. Tag wurde das Muttertier durch Genickbruch getötet und die Embryonen freipräpariert.

Schema zum Versuchsansatz:

Tag	1.	17.	18.
	V.P.	1. Appl.	Präparation

Die Lebern der Embryonen wurden herauspräpariert. Die Einzelheiten über die Leberaufarbeitung sind im vorherigen Kapitel ausführlich beschrieben worden.

3.7. Statistik

1. Die Berechnung der dominanten Letalmutationen erfolgte nach der Formel von EHLING et al. (1968):

$$100 - \frac{\left[\begin{array}{l} \text{Lebende Embryonen pro Weibchen} \\ \text{(Behandlungsgruppe)} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{l} \text{Lebende Embryonen pro Weibchen} \\ \text{(Kontrolle)} \end{array} \right]} \times 100$$

2. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem χ^2 - Test. Die Werte wurden als signifikant angenommen, wenn die Bedingung $P < 0,005$ gegeben war.

Da die Mutagenität von MMS bekannt war, brauchte die 0-Hypothese nicht zugrunde gelegt zu werden, sondern es konnte ein einseitiger Test durchgeführt werden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Toxizität

Je 10 NRMI Mäusen injizierten wir i.p. 10, 20, 40 und 80 mg MMS/kg. Während alle Tiere die Injektion von 10 und 40 mg MMS/kg überlebten, starben nach 80 mg MMS/kg alle Tiere dieser Gruppe. Bei den Mäusen trat zuerst eine Lähmung der hinteren Extremitäten und dann der vorderen Extremitäten auf. Nach unseren Beobachtungen wirkt MMS zuerst toxisch auf das periphere, dann auf das Zentralnervensystem sowie auf das Atemzentrum (Tabelle Nr. 2).

Dosis mg MMS/kg	Zahl der be- handelten Tiere	Zahl der überleben- den Tiere	Überlebende Tiere in %	Zahl der toten Tiere	Zeitpunkt des Todes nach MMS Applikation
10	10	10	100	-	-
20	10	10	100	-	-
40	10	10	100	-	-
50	10	-	-	10 = 100 %	30-150 Min.

Tabelle Nr. 2: Toxische Schädigung von MMS auf weibliche Mäuse
des Stammes N1R1.

4.2. Chromosomenanalyse des Knochenmarks.

Die Chromosomenanalyse des Knochenmarks wurde bei 10 Kontroll- und 30 Versuchstieren durchgeführt. Pro Tier wurden 100 Metaphasen ausgewertet. Bei der Kontrolle fanden sich keine Metaphasenanomalien. Bei der Gabe von 10 mg MMS/kg beobachtete man bei 1000 Metaphasen sowohl Chromatidengaps, Chromatidenbrüche als auch Chromatidenfragmente (Tabelle Nr. 3). Insgesamt war eine Aberrationsrate von 1,1 % zu verzeichnen. Bei 20 mg MMS/kg verzeichnete man in 1000 Metaphasen neben Chromatidengaps, Chromatidenbrüche, Chromatidenfragmente, Chromosomenfragmente auch multiple Aberrationen. Insgesamt wurde eine Aberrationsrate von 2,9 % beobachtet. Bei 40 mg MMS/kg wurden in 1000 Metaphasen Chromatidengaps, Isochromatidengaps, Chromatidenbrüche, Chromatidenfragmente, Chromosomenfragmente, Chromatidendeletionen, Intrachange wie Ringchromosomen beobachtet. Insgesamt fanden sich hier Aberrationsraten von 6,8 % (Tabelle 3 und 4).

Die tierexperimentelle Untersuchung deutet an,

daß durch Erhöhung der Dosis des Mutagens sich die Aberrationsraten von Chromosomen im Knochenmark der Mäuse erhöhen.

Substanz mg MMS/kg	Zahl der Tiere	Metapha- sen	Chroma- tidgap	Chromo- sogap	Chroma- tiden- bruch	Chroma- tiden- deletion	Chroma- tiden- fragment	Chromo-Ring m.A.Inter- somen- frag- ment	change	%
10	10	1000	2	0	3	0	6	0	0	1,1
20	10	1000	6	0	2	0	18	2	1	2,9
40	10	1000	24	2	2	5	28	3	0	6,8
NaCl- Lösung	10	1000	0	0	0	0	0	0	0	-

Tabelle Nr. 3: Chromosomenaberration im Knochenmark weiblicher NMRI-Mäuse nach

Applikation von 10, 20 oder 40 mg MMS/kg.

Dosis mg MMS/kg	Metaphasen n	Aberrante Metaphasen inkl. Gaps % χ^2 P	Aberrante Metaphasen exkl. Gaps % χ^2 P
10	1000	1,1 11,06 < 0,005	0,9 9,04 < 0,005
20	1000	2,9 29,43 < 0,005	2,3 23,27 < 0,005
40	1000	6,8 70,39 < 0,005	4,2 42,90 < 0,005
Kontrolle	1000	0	0

Tabelle Nr. 4: Rate strukturell aberranter Metaphasen inkl. und exkl. Gaps
in Abhängigkeit von der MMS Dosishöhe.



Abb. 1: Metaphasen aus dem Knochenmark mit Aberrationen.

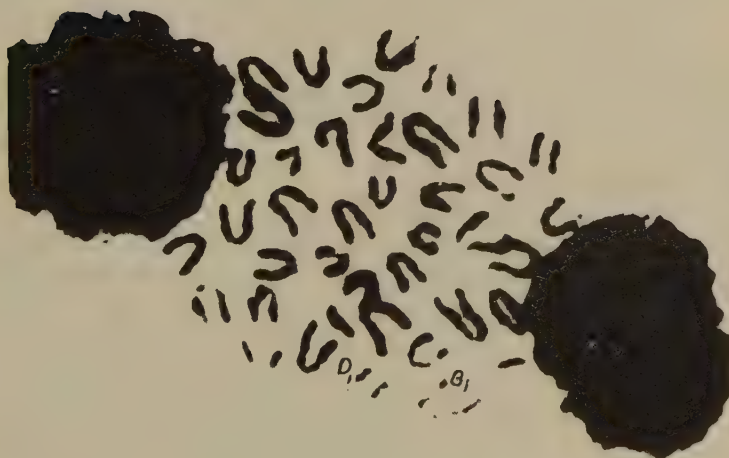


Abb. 2: Metaphasen aus dem Knochenmark mit Bruch und Deletion.

4.3. Dominant-Letal-Test

Ausgewertet wurden 12 weibliche Mäuse in der Kontrolle und 12 in der Versuchsserie. In der Kontrolle fanden sich 137 Implantate, von denen 5 abgestorben waren (3,64 %). Im Versuch (20 mg MMS/kg) fanden sich unter 136 Implantaten 4 Tote (2,9 %) (Tabelle 5).

Die Häufigkeit dominanter Letalmutationen war somit im Versuch gegenüber der Kontrollserie nicht erhöht.

Dosis mg MMS/kg	Zahl der Tiere	Zahl der Implan- tate	Zahl der toten Implan- tate	% der toten Implan- tate	leben- de Im- plan- tate pro Weib- chen	domi- nante Letal- muta- tionen
20	12	136	4	2,9	11	0
Kontrol- le	12	137	5	3,64	11	0

Tabelle Nr. 5: Prozentsatz der toten Implantate bei 20 mg MMS/kg im Vergleich zu den Kontrolltieren.

4.4. Chromosomenanalyse der im DL-Test überlebenden Embryonen.

Die Chromosomenanalyse der embryonalen Lebern wurde an 10 Versuchsembryos und 10 Kontroll-embryos durchgeführt. Bei den Kontrollembryos traten an strukturellen Aberrationen nur Fragmente auf. In den Metaphasen der Versuchsembryos wurden außerdem noch Chromatidengaps, Chromosomengaps, Chromatidenbrüche und einige wenige multiple Aberrationen (Tabelle 6) beobachtet. Insgesamt wurden pro Serie 500 Metaphasen zytologisch bei 1000-facher Vergrößerung analysiert.

Die Rate strukturell aberranter Metaphasen inklusive Gaps lag nach Applikation von 20 mg MMS/kg bei 13,4 %. Exklusive Gaps war die Rate von 0 % in der Kontrolle auf 8,6 % erhöht.

Dosis mg MMS/kg	G'	G''	B'	F'	mA	R	(Total)
20	23	1	13	27	2	1	67
Kontrolle	-	-	-	5	-	-	-

Tabelle Nr. 6: Chromosomenanalyse der im DL-Test überlebenden Embryonen. Zahl der ausgewerteten Metaphasen pro Gruppe = 500.

Die Gesamtzahl struktureller Aberrationen lag bei einer Dosis von 20 mg MMS/kg bei superovulierten weiblichen Mäusen mit 67 am höchsten gegenüber 5 in der Kontrolle registrierten Aberrationen. Als häufigster Aberrationstyp wurden in den Versuchsgruppen Fragmente und Gaps gefunden (Tabelle 7).

Dosis mg MMS/kg	n-Embryos	n-Metapha- sen	inkl. Gaps n	%	χ^2	P	exkl. Gaps n	%	χ^2	P
20	10	500	67	13,4	57,53	<0,005	43	8,6	44,93	<0,005
Kontrolle	10	500	5	0,2	-	-	0	0	-	-

Tabelle Nr. 7: Chromosomenanalyse der im DL-Test überlebenden Embryonen.

Rate strukturell aberranter Metaphasen.

4.5. Diaplazentare Mutagenese.

Nach diaplazentarer Behandlung wurden embryonale Leberzellen von 20 Versuchsembryonen und 10 Kontrollembryonen zytologisch untersucht. In jedem wurden 50 Metaphasen bei 1000-facher Vergrößerung analysiert (Tabelle 8).

An strukturellen Aberrationen traten bei den Kontrollembryonen Anomalien vom Typ F⁺ auf, während bei der Auswertung der Metaphasen der Versuchsembryos außerdem noch Chromatidengaps, Chromosomengaps, Chromatidenbrüche in den zytologisch untersuchten Metaphasen beobachtet werden konnten (Tabelle 9).

Die Rate an Metaphasen mit Aberrationen lag im Versuch nach Injektion von 20 mg MMS/kg bei 0,2 % und bei 40 Mg MMS/kg bei 1,6 % gegenüber der Kontrolle von 1,0 % (Diagramm Nr. 1).

Dosis mg MMS/kg	Zahl der Tiere	Zahl der lebenden Implantate	Zahl der analysie- renden embryonalen Leberzellen	Untersuchungs- methode
20	12	98	500	Chromosomen- analyse
40	5	50	500	"
Kontrolle	12	132	500	"

Tabelle Nr. 8: Chromosomenanalyse embryonaler Lebern.

Dosis mg MMS/kg	Zahl der Embryonen	Metapha- sen (n)	Aberrante Metaphasen inkl.Gaps		Aberrante Metaphasen exkl.Gaps	
			n	%	n	%
20	10	500	1	0,20	1	0,20
40	10	500	8	1,60	2	0,40
Kontrolle	10	500	5	1,00	5	1,00

Tabelle Nr. 9: Strukturelle Chromosomenaberrationen in
embryonalen Leberzellen diaplazentar be-
handelter Embryonen.

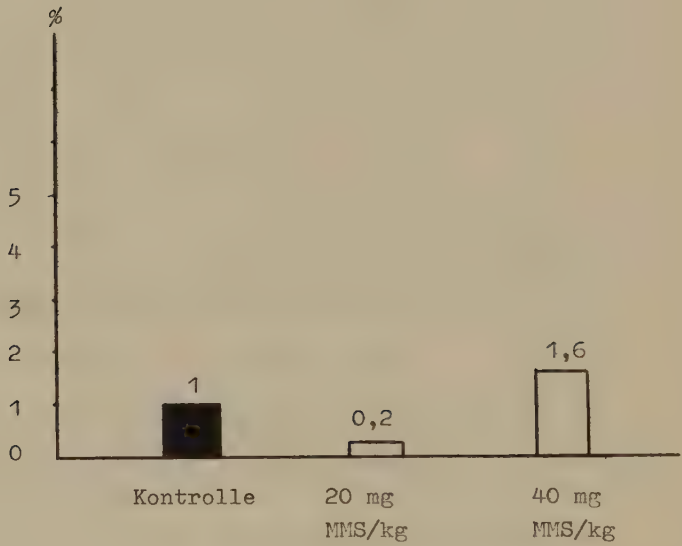


Diagramm Nr. 1: % embryonale Leberzellen mit
strukturellen Aberrationen
nach diaplazentarer Applika-
tion von MMS.

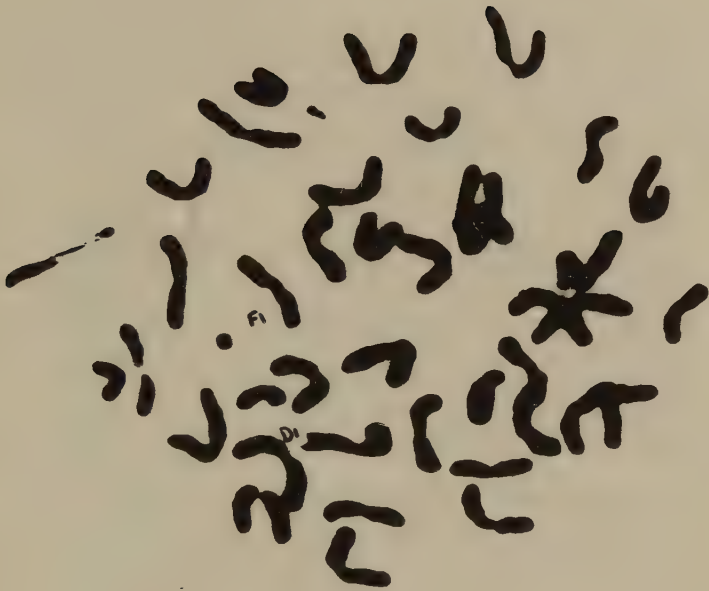


Abb.: 3: Metaphasen aus embryonalem Lebergewebe
mit Fragment und Deletion.

5. DISKUSSION

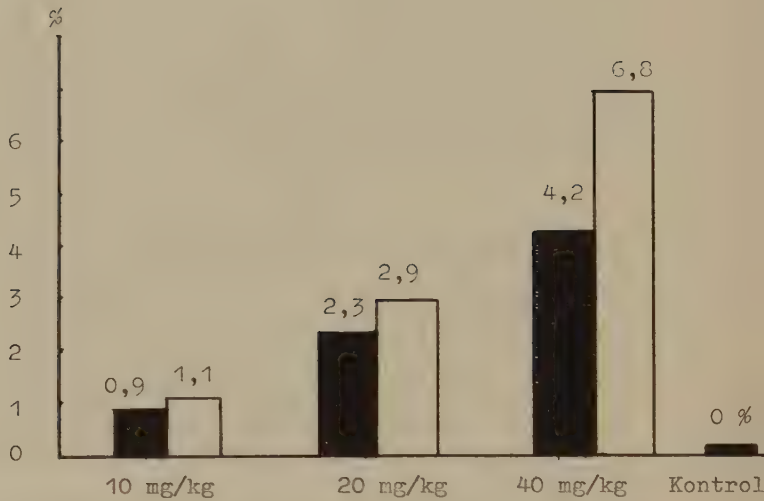
Wie bereits in der Einleitung dargestellt, liegen zahlreiche Mutagenitätsuntersuchungen mit MMS vor. In diesen Untersuchungen konnte zwar die Mutagenität nachgewiesen werden, jedoch traten nachweisbare Effekte erst nach Applikation hoher Dosen auf. FREI et al. (1975) injizierten i.p. jungen C₅₇B Mäusen die sehr hohe Dosis von 120 mg MMS/kg. In der zytologischen Knochenmarkanalyse fanden sie erhöhte Aberrationsraten der Metaphasen (Tötung der Tiere 24 Stunden nach Behandlung). Die Untersuchung von TATES und NATARAJAN (1977) an 6 Tieren mit steigender Dosierung von 10, 20, 40, 80 und 160 mg MMS/kg ergaben, daß im Knochenmark auch nach Applikation der höchsten Dosis von 160 mg MMS/kg die Rate an Metaphasen mit Aberrationen nur von 0,7 % (Kontrolle) auf 2,0 % anstieg.

In der vorliegenden Arbeit wurde MMS auf seine chromosomenschädigende Wirkung auf das Knochenmark weiblicher Mäuse des NMRI Stammes getestet. Unsere experimentellen Untersuchungen stimmen

mit den Untersuchungen von FREI (1975) überein. Der Prozentsatz an Knochenmarkzellen mit Aberrationen war in den Versuchsserien gegenüber der Kontrolle erhöht. Desweiteren ließen sich Dosis-Effekt-Beziehungen nachweisen.

Im Knochenmarktest wirkt MMS eindeutig mutagen (Diagramm Nr. 2-4). Mit zunehmender Dosis steigt die Aberrationsrate fast linear an. Hier zeigte sich, daß MMS in den drei Dosierungen eine signifikante Steigerung der aberranten Metaphasen verursachte.

Die Differenzierung zwischen aberranten Metaphasen inklusive und exklusive Gaps erfolgte deshalb, weil bisher noch weitgehend ungeklärt ist, inwieweit man die Rate der Gaps zur Beurteilung der Mutagenität einer Substanz heranziehen kann. Gaps werden zwar sowohl durch ionisierende Strahlen als auch durch chemische Mutagene als häufigster Aberrationstyp induziert und können auch eine deutliche Dosisabhängigkeit zeigen (EVANS, 1962, 1963; GEBHART, 1971). Hinsichtlich der Indikation mutagener Wirkung wird ihnen jedoch nicht die gleiche Bedeutung beigemessen wie anderen Aberrationstypen.



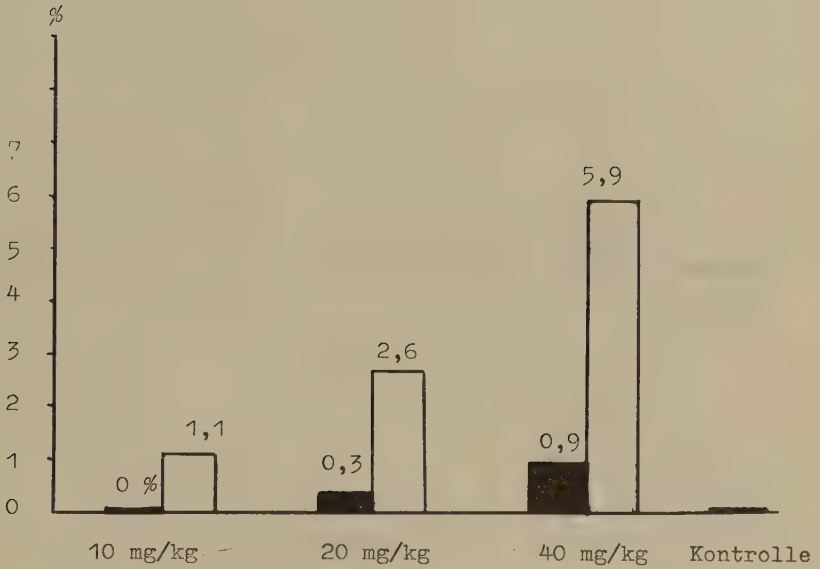
Aberrante Metaphase
inkl. Gaps.



Aberrante Metaphase
exkl. Gaps.



Diagramm Nr. 2: Häufigkeit strukturell aberranter Metaphasen inkl. und exkl. Gaps in Abhängigkeit von der Dosishöhe MMS.



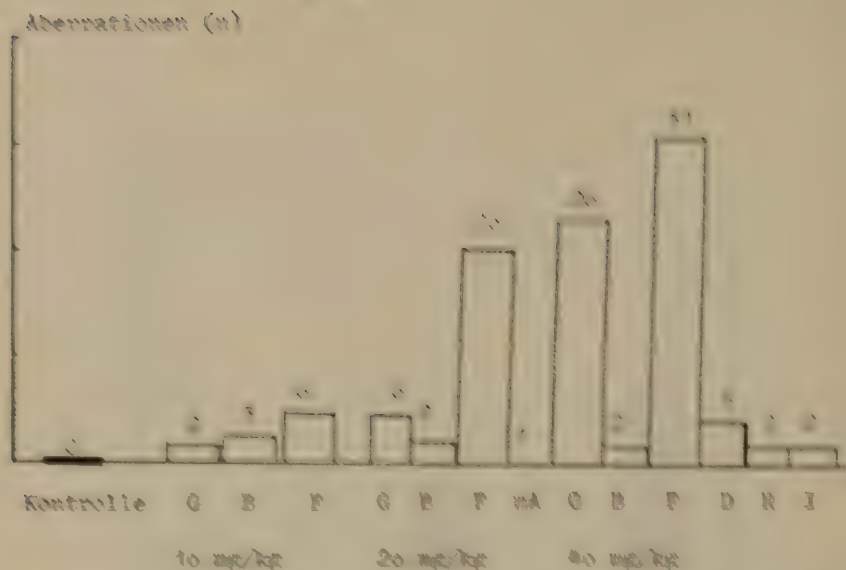
Aberrante Metaphase
von Chromatidentyp.



Aberrante Metaphase
von Chromosomentyp.



Diagramm Nr. 3: Häufigkeit strukturell aberranter Metaphasen von Chromatiden und Chromosomentyp in Abhängigkeit von der Dosis-
höhe HNS.



G = Gaps

D = Deletion

B = Brüche

R = Ring

F = Fragment

I = Interchange und

mA = multiple Aberration

Intrachange

In Diagramm Nr. 4 sind die gefundenen Aberrationen nach ihrem Typus getrennt aufgeführt.

Die Häufigkeit des Auftretens von Gaps, Brüche, Deletionen, Fragmenten stehen in Abhängigkeit von der Dosishöhe MMS im Knochenmark.

WILLIAMS (1973) ist die der Gap zugrundeliegenden Veränderungen für lokale Entspiralisierung oder DNS-Verluste. Der Nachweis, daß es sich um echte morphologische Veränderungen der Chromosomen handelt, gelang SCHEID und TRANT (1976, 1977) mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen. Wollte man dem Gap jedoch die Verteilung von Mutationen zuschreiben, müßte in der Anaphase häufiger Fragmente und in der darauffolgenden Interphase eine größere Zahl von Kleinkernen zu beobachten sein, als das tatsächlich der Fall ist, EVANS und WILLIAMSON (1959).

WILLIAMS (1977) untersuchte bereits die mutagene Wirkung von HNS im Dominant-Letal-Test. In seinen Experimenten wurden die Tiere in einigen Versuchserien ebenfalls zusätzlich nach der Applikation der Testsubstanz verpaart. Der Paarungsintervall betrug bis zu 4 Tagen. Die Rate an toten Implantaten in der Kontrolle betrug 3,9 %. Nach Injektion von 10 µg HNS/kg wurden 8 % tote Implantate beobachtet. Die Rate der dominanten Letalmutationen war also gegenüber der Kontrolle

nicht erhöht. Schwache mutagene Wirkungen zeigten sich bei 20 mg MMS/kg; die Rate der toten Implantate lag bei 12,2 %.

In diesen Versuchen wurden Männchen behandelt und mit unbehandelten Weibchen verpaart. Es ist bekannt, daß in der Spermatogenese große Stadiensensibilitätsunterschiede bestehen. Am unempfindlichsten chemischen Mutagenen gegenüber sind Spermatiden und Spermien, die in den oben aufgeführten Versuchen zur Befruchtung kamen. In der Oogenese gilt die präovulatorische Phase als das sensibelste Stadium (RÖHRBORN und HANSMANN, 1971). In der vorliegenden Arbeit wurden daher Weibchen mit MMS behandelt und mit unbehandelten Männchen verpaart. Es zeigten sich jedoch, wie bei der Behandlung der männlichen Tiere (EHLING, 1977) keine induzierten Letalmutationen.

Da aber MMS als Mutagen bekannt ist, war zu untersuchen, ob eventuell Mutationen induziert worden sind, die aber nicht zum Absterben der Embryonen führten. Daher wurden die lebenden Embryonen

auf Chromosomenaberrationen hin untersucht. Dabei war eine hohe Aberrationsrate in den Metaphasen zu beobachten. Die Gesamtzahl struktureller Aberrationen lag bei einer Dosis von 20 mg IMS/kg mit 13,4 % am höchsten gegenüber 1 % der in der Kontrolle registrierten Aberrationen.

In weiteren Untersuchungen sollte geprüft werden, ob MMS die Plazentaschranke überwindet und Mutationen in Embryonen induziert. In diesen tierexperimentellen Untersuchungen zeigt sich bei der diaplazentaren Mutagenese von MMS folgendes: MMS, am 17. Schwangerschaftstag appliziert, passiert die Plazentamembranen und induziert Mutationen. Die Rate der Metaphasenaberrationen steigt mit steigender MMS-Dosis. Bei 20 mg liegt die Aberrationsrate bei 0,2 % und bei 40 mg wird eine Aberration von 1,6 % verzeichnet, gegenüber 1 % in der Kontrollserie.

Die Versuche zeigen, daß MMS die Plazentaschranke passiert und Mutationen zu induzieren vermag. Die hier vorliegenden Daten bestätigen die Li-

teraturbefunde. MMS wirkt mutagen, allerdings erst nach Applikation hoher Dosen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde MMS auf seine mutagene Wirkung im Knochenmark adulter Mäuse und in embryonalen Lebern untersucht. Die Versuchstiere erhielten 10, 20, 40 und 80 mg MMS/kg intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere seziert. Als Testmethode kam die zytogenetische (chromosomale) Knochenmarkanalyse zur Anwendung. Aberrationsraten lagen nach Applikation von 10 mg MMS/kg bei 1,1 %. 20 mg MMS/kg induzierten 2,9 % und 40 mg MMS/kg erhöhten den Prozentsatz auf 6,8 %. 80 mg MMS/kg zeigte eine hohe toxische Wirkung; alle Versuchstiere verstarben.

Im Dominant-Letal-Test wurde weiblichen Mäusen nach hormonaler Vorbehandlung 20 mg MMS/kg in der präovulatorischen Phase injiziert. Danach wurden sie mit unbehandelten männlichen Mäusen verpaart. Am 18. Tag der Trächtigkeit wurden die weiblichen Mäuse seziert und die toten und lebenden Embryonen registriert. Die Embryonen, die zu diesem Zeitpunkt der Trächtigkeit lebten, wur-

den zytologisch aufgearbeitet. Während in der Kontrolle nur 0,2 % embryonale Leberzellen mit Chromosomenaberrationen gefunden wurden, waren es in der Versuchsserie 13,4 %.

Bei der diaplazentaren Mutagenese wurde weiblicher Mäusen 20 und 40 mg MMS/kg am 17. Tag post conception intraperitoneal injiziert. Am 18. Tag p.c. wurden die Lebern diaplazentar behandelter Embryonen zytologisch untersucht. Die Zahl aberranter Metaphasen nach Applikation von 20 mg MMS/kg lag bei 0,2 %. 40 mg MMS/kg induzierten 1,6 %.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ADLER, I.D.,
LANG, R.:
Heritable translocation
test and dominant lethal
assay in male mice with MMS.
Mutat Res 48, 75-88.
- ARNOLD, D.,
KENNEDY, G.L.,
KEPLINGER, M.L.:
Mutagenic evaluation of
Hexachlorophone.
Toxicol App Pharmacol 33,
185 (1975).
- ARNOLD, D.W.,
KENNEDY, G.L.,
KEPLINGER, M.L.J.,
CALANDRA, J.C.:
Dose Response an No-Effect
Levels in 2 known Mutagens.
Toxicol App Pharmacol 25, 464
(1973).
- AUERBACH, C.,
Robson, J.M.:
Test of chemical substances
for mutagenetic action.
Proc R Soc Edinb 62, 284-291
(1947).
- BASLER, A.,
HERBOLD, B.:
Mutagenese und Umwelteinflüsse.
Hippokrates 47, 123-141
(1976 a).
- BASLER, A.,
BUSELMAIER, B.,
RÖHRBORN, G.:
Elimination of Spontaneous and
Chemically Induced Chromosome
Aberrations in Mice during
Early Embryogenesis.
Hum Genet 33, 121-130 (1976 b).

BASLER, A.,
BRUCKLACHER, H.,
NOBIS, F.,
RÖHRBORN, G.:

Comparative investigations
with Trypaflavin in Meta-
phase II Oocytes and in do-
minant lethal Assay.

Hum Genet 40, 87-92 (1977).

BARTHELMESS, A.:

Mutagene Arzneimittel.

Arzneim Forsch 6, 118-157
(1956).

Mutagenetic substances in
the human environment.

In: Vogel, F. and G. Röhrborn
(eds.). Chemical mutagenesis
in mammals and man.

Springer, Berlin-Heidelberg-
New York (1970).

BATEMANN, A.J.:

Mutagenetic sensitivity of
maturing germ cells in the
male mouse.

Heredity 12, 213-232 (1958)
in the rate and mice with
Trethylentetramin.

Genet Res Cambridge 1,
381-392 (1960).

BREWEN, J.G.,
PAYNE, H.S.:

Studies on chemically induced
dominant lethality. II. Cyto-
genetic studies of MMS-induced
dominant lethality in maturing
Dictyate Mouse Oocytes.

Mutat Res 37, 77-82 (1976).

BREWEN, J.G.,
PAYNE, H.S.,
JONES, K.P.,
PRESTON, R.J.:

Studies on chemically
induced dominant lethality.
I. the cytogenetic basis of
MMS-induced dominant lethality
in postmeiotic male germ cells.
Mutat Res 33, 239-250 (1975).

CLAPP, N.K.:

Carcinogenicity of Nitro-
samines and Methanesulphonate
Esters given intraperitoneally
in RF Mice.

Int J Cancer 12, 728-733
(1973).

CLAPP, N.K.,
CRAIG, A.W.,
TOYA, R.E.Sr.:

Oncogenicity by Methyl
Methanesulphonate in male
RF Mice.

Science 161, 907-912 (1968).

DATTA, P.K.,
FRIGGER, H.,
SCHLEIERMACHER, E.:

The effect of chemical Mutagens
on mitotic chromosomes of the
Mouse in Vivo.

In: Vogel, F. and Röhrborn, G.
(eds.). Chemical Mutagenesis
in Mammals and Man.

Springer, Berlin-Heidelberg-
New York (1970).

DEAN, B.J.,
JOHNSTONE, A.:

Dominant lethal Assay in male
Mice: Evaluation of experimental
Design, statistical methods

- and the sensitivity of
Charles River (CD 1) Mice.
Mutat Res 42, 269-278 (1977).
- DRUCKREY, H.:
Genotypes and phenotypes of
ten inbred strains of BD-rats.
Arzneim Forsch 24, 1274 (1971).
- DRUCKREY, H.,
KRUSE, H.,
PREUSSMANN, R.,
IVANKOVIC, S.:
Cancerogene alkylierende Sub-
stanzen.
Z. Krebsforschung 74, 241-273
(1970).
- EHLING, U.H.,
NEUHERBERG, GER.:
Dominant lethal mutations in
male mice.
Arch Toxicol 38, 1-11 (1977).
- EHLING, U.H.,
CUMMING, R.B.,
MALLING, H.V.:
Induction of dominant lethal
mutations by alkylating agents
in male mice.
Mutat Res 5, 417-428 (1968).
- EVANS, H.J.:
Chromosome aberration induced
by ionising radiations.
Int Rev Cytol 13, 221-321
(1963).
- EVANS, H.J.,
WILLIAMSON, F.S.:
The relative biological
efficiency of simple dosis
of fast neutrons and gamma-rays
on vicia faba roots and the
effect of Oxygen.

- FREI, J.V.,
VENITT, S.:
Int J Rad Biol 1, 216-229
(1959).
Chromosome damage in the
Bone Marrow of Mice treated
with Methylating Agents Methyl
Methanesulphonate and N-Methyl-
N-Nitrosourea in the presence
or absence of Coffeine, and
its Relationship with Thymoma
induction.
Mutat Res 29, 89-96 (1975).
- GERMAN, J.:
Bloom's Syndrome. I. Genetical
and Clinical observations in
the first twenty-seven patients.
Amer J Hum Genet 21, 196
(1969).
- GRÜNEBERG, H.:
Eine Brücke von der Maus zum
Menschen.
Strahlenschutz 17, 1-8 (1965).
- HANSMANN, I.:
Chromosome aberrations in
metaphase II Oocytes. Stage
sensitivity in the mouse
oogenesis to amethopterin and
Cyclophosphamide.
Mutat Res 22, 175-191 (1974).
- INUI, N.Y.,
NISHI,
TAKETONI, M.:
Mutagenic effect of orally
given AF-2 on embryonic cells
in pregnant Syrian hamsters.
Mutat Res 57, 69-75 (1978).

IVANKOVIC, S.,
PREUSSMANN, R.:

Cancerogene alkylierende Substanzen.

Z. Krebsforschung 74, 241-273 (1970).

KLEIHUES, P.,
MENDE, CHR.,
REUCHER, W.:

Tumours of the peripheral and Central Nervous System induced in BD-Rats by Prenatal Application of Methyl-Methanesulphonate.

Eur J Cancer 8, 641-645 (1972).

KRATOCHVIL, J.,
BREWEN, J.G.:

Präimplantativer Verlust dominanter Letalmutationen nach Behandlung der männlichen Maus mit MMS.

GSF-Bericht B 565, 5-17 (1975).

LAWRENCE, S.,
GOLDSTEIN, L.S.:

Methyl-Methanesulphonate induced Dominant lethal Mutations in male Mice detected in Vitro.

Mutat Res 42, 135 (1977).

MACHEMER, L.:

Collaborative study of MMS mutagenicity with the dominant lethal assay in mice.

GSF-Bericht B 564, 7-28 (1975).

MACHEMER, L.,
HESS, R.:

Comparative Dominant Lethal Studies with MMS in the Mouse.

Experientia 27, 1050-1052 (1971).

NEARY, G.J.,
EVANS, H.J.:

Chromatid breakage by
irradiation and the Oxygen
effect.

Nature 182, 890-891 (1958).

OEHLKERS, F.:

Die Auslösung von Chromosomen-
mutationen durch Einwirkung
von Chemikalien.

Z. Vererbungslehre 81,
313-341 (1943).

PARKIN, R.,
WAYNFORTH, H.B.,
MAGEE, P.N.:

The Activity of some Nitroso
compounds in the Mouse domi-
nant lethal mutation Assay.
I. Activity of N-Nitroso-N-
Methylurea, N-Methyl-N-Nitroso-
N-Nitroguanidine and Methyl-
Methanesulphonate (MMS).

Mutat Res 21, 155-161 (1973).

PROPPING, P.,
BUSELMAYER, W.,
RÖHRBORN, G.:

Kritische Betrachtung über
die intra-animale Kultur von
Mikroorganismen, eine Methode
zum Nachweis chemisch induzier-
ter Mutationen.

Arzneim Forsch 23, 746-749
(1973).

RAPOPORT, J.A.:

Carbonylverbindungen und der
chemische Mutationsmechanismus.

C R Acad Sci USSR 54, 65-67
(1946).

- REVELL, S.H.: Chromosome breakage by x-rays and radiomimetic substances in vicia. Heredity 6, 107-124 (1953).
- REVELL, S.H.: The accurate estimation of chromatid breakages and its relevance to a new interpretation of chromatid aberration induced by ionizing radiations. Proc R Soc 150, 563-589 (1959).
- RÖHRBORN, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene. Experientia 16, 523-529 (1960) über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen. Hum Genet 1, 205-231 (1965).
- RÖHRBORN, G.,
BERRANG, H.: Dominant lethals in young female mice. Mutat Res 4, 231-233 (1966).
- RÖHRBORN, G.,
HANSMANN, I.: Induced chromosome aberrations in unfertilized Oocytes of mice. Hum Genet 13, 184-198 (1971).
- RÖHRBORN, G.,
KÜHN, O.,
HANSMANN, I.,
THON, K.: Induced chromosome aberrations in early embryogenesis of mice. Hum Genet 11, 316-322 (1971).

RUSSEL, W.L.,
RUSSEL, L.B.,
KIMBALL, A.W.:

The relative effectiveness of neutrons of a nuclear detonation and from a Cyclotron in inducing dominant lethals in the mouse.

Amer Naturalist 88, 269-286 (1954).

SCHEID, W.,
TRAUT, H.:

Ultraviolet-microscopical studies on achromatic lesions (Gaps) induced by x-rays in the chromosomes of vicia faba.

Mutat Res 10, 159-161 (1970).

SCHEID, W.,
TRAUT, H.:

Visualization by scanning electron microscopy of achromatic lesions (Gaps) induced by x-rays in chromosomes of vicia faba.

Mutat Res 11, 253-255 (1971).

SCHMID, W.,
ARAKAKI, D.T.,
BRESLAU, N.A.,
CULBERTSON, U.J.C.:

Chemical mutagenesis. The Chinese Hamster bone marrow as an in vivo test system. I. Cytogenetic results on basic Aspects of the Methodology, obtained with Alkylating Agents.

Hum Genet 11, 103-118 (1971).

SHERIDAN, W.:

The induction by x-irradiation of dominant lethal mutations in spermatogonia of mice.

Mutat Res 2, 67-74 (1965).

STAVROU, D.:

Zur vergleichenden Pathologica
der Tumoren des Nervensystems.
Zbl vet Med A 18, 585 (1971).

SWANN, P.F.,
MAGEE, P.N.:

Induction of rat kidney tumors
by ethylmethanesulphonate and
nervous tissue by methyl-
methanesulphonate and ethyl-
methanesulphonate.
Nature 223, 947 (1969).

TATES, A.D.,
NATARAJAN, A.T.:

Chromosom aberrations in bone
marrow of mice from MMS.
Mutat Res 42, 135-137 (1977).

VOLLMAR, J.,
STUCKY, W.:

Zur statistischen Auswertung
des dominanten Letaltests bei
der männlichen Maus.
GSF-Bericht B 565, 24-30
(1975).

Herrn Professor Dr. G. Röhrborn danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine wohlwollende Betreuung bei der Durchführung der Experimente. Sein fachlicher Rat und seine wertvollen Anregungen trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Auch möchte ich ihm für die Überlassung der Versuchstiere und die Bereitstellung der technischen Einrichtungen danken.

Herrn Dr. A. Basler danke ich ganz besonders für die intensive und großzügige Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit, sowie im praktischen Teil als auch bei der theoretischen Erarbeitung des Stoffes.

LEBENS LAUF

Am 23. 9. 1938 wurde ich als Sohn des Assadollah Simaifar und seiner Ehefrau Zahra in Teheran (Iran) geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des Gymnasiums legte ich 1958 am Gymnasium in Teheran mein Abitur ab. 1959 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Mainz. Ab dem Wintersemester 1964 wechselte ich zum weiteren Medizinstudium an die Universität Düsseldorf über. Im Dezember 1966 legte ich mein medizinisches Staatsexamen an der Universität Düsseldorf ab. Seit 1974 bin ich Facharzt für Allgemeine Chirurgie.

